

## Prohlášení

Diplomová práce s názvem „**Vliv polymorfních variant kandidátního lokusu na spektrum mastných kyselin kravského mléka**“ (Effect of polymorphic variants of the candidate locus on fatty acid spectrum of bovine milk) nemůže být vložena do systému STAG vzhledem ke skutečnosti, že zveřejnění dat obsažených ve výše zmíněné práci v roce 2018 by bránilo publikování těchto dat ve vědeckém časopisu.

Diplomová práce bude v tištěné podobě k dispozici v Akademické knihovně JU.

Vedoucí diplomové práce

prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.



Autor diplomové práce

Bc. Jana Záhorková



V Českých Budějovicích, dne 6. 4. 2018

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**Diplomová práce**

**Vliv polymorfních variant kandidátního lokusu  
na spektrum mastných kyselin kravského mléka**

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Autor diplomové práce: Bc. Jana Záhorková

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana ZÁHORKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z15402**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**  
Název tématu: **Vliv polymorfních variant kandidátního lokusu na spektrum  
mastných kyselin kravského mléka**  
Zadávající katedra: **Katedra zootechnických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Využití molekulárně genetických metod je již běžnou součástí šlechtění hospodářských zvířat. Vedle genotypizace SNP na čípech a využití v genomové selekci je pozornost věnována rovněž genotypizaci kandidátních lokusů, genů velkého účinku. V genetickém výzkumu je jedním z hlavních cílů těchto postupů analyzovat vliv genotypu zvířete na kvalitu produktu, potravinové suroviny. Diplomová práce se bude týkat genotypizace kandidátního lokusu.

Cílem diplomové práce je provést genotypizaci kandidátního lokusu s potenciálním vztahem ke spektru mastných kyselin v kravském mléce.

Zavedete metodiku pro laboratorní analýzu kandidátního lokusu. Provedete genotypizaci panelu krav. Výběr lokusu provede vedoucí práce v závislosti na aktuální potřebě školitelského pracoviště tak, aby výsledky bylo možné použít pro řešený výzkumný projekt. Provedete asociační analýzu vztahu genotypu resp. alel ke spektru mastných kyselin v mléčném tuku. Ke statistickému vyhodnocení použijete vhodné metody a programové balíky. Provedete interpretaci zjištěných výsledků.

Rozsah grafických prací: 4 tabulky, 2 grafy  
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická  
Seznam odborné literatury:

Li X., Buitenhuis A. J., Lund M. S., Li C., Sun D., Zhang Q., Poulsen N. A., Su G. (2015): Joint genome-wide association study for milk fatty acid traits in Chinese and Danish Holstein populations. J. Dairy Sci., 98, 8152-8163, DOI: 10.3168/jds.2015-9383.

Niranjan S. K., Goyal S., Dubey P. K., Kumari N., Mishra S. K., Mukesh M., Kataria R. S. (2016): Genetic diversity analysis of buffalo fatty acid synthase (FASN) gene and its differential expression among bovines. Gene, 575, 506-512, DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.020.

Yudin N. S., Voevoda M. I. (2015): Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle. Russian J. Genet., 51, 506-517, DOI: 10.1134/S1022795415050087.


Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.  
Katedra zootechnických věd  
Konzultant diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.  
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 29. března 2016  
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1888, 370 06 České Budějovice

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

L.S.

  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 29. března 2016

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20. 4. 2018    Podpis studenta .....

## **Poděkování**

Poděkování patří panu prof. Ing. Čítkovi, CSc., za odborné vedení a cenné rady k mé diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Hanusové Ph.D. za odbornou pomoc při laboratorních metodách. Práce byla finančně podpořena projektem QJ1510339 a GAJU-002/2016/Z Genetika, zdraví zvířat a kvalita produktů jako základ konkurenceschopnosti.

## Abstrakt

Celosvětové studie poukazují na vliv polymorfismu vybraných genů na mléčnou produkci a obsah mastných kyselin.

Cílem diplomové práce byla genotypizace kandidátního lokusu *FASN* se zaměřením na mléčnou užitkovost a spektrum mastných kyselin v závislosti na genotypu. V práci je popsána charakteristika kravského mléka, mléčného tuku a mastných kyselin v mléčném tuku. Dále se práce zabývá genomem skotu a potenciálním vlivem polymorfismu kandidátních genů ovlivňující mastné kyseliny mléčného tuku. Genotypy pro *FASN* byly stanoveny metodou PCR-RFLP, mléčná užitkovost vybraných dojnic byla statisticky hodnocena podle ukazatelů mléčné produkce za 1. laktaci v jednotlivých chovech a stanovení mastných kyselin proběhlo pomocí spektrofotometrie s následným statistickým vyhodnocením. Výsledné genotypy u vybraných chovů byli pouze dva, genotyp *GG* s vyšší relativní četností než genotyp *AG*. Z výsledků není patrný žádný statisticky prokazatelný rozdíl mezi genotypy pro *FASN* v závislosti na mléčnou užitkovost a spektrum mastných kyselin.

**Klíčová slova:** mléko, mléčný tuk, mastné kyseliny, syntáza mastných kyselin, *FASN*

## **Abstract**

Global studies show the effect of polymorphism of selected genes on dairy production and fatty acid spectrum.

The aim of the diploma thesis was genotyping of candidate *FASN* locus with a focus on milk yield and fatty acid spectrum depending on genotype. The thesis describes the characteristics of cow's milk, milk fat and fatty acids in milk fat. Furthermore, the thesis deals with the genome of cattle and the potential influence of polymorphism of candidate genes affecting fatty acids of milk fat. Genotypes for *FASN* were determined by the PCR-RFLP method, the milk yield of selected dairy cattle was statistically evaluated according to the milk production indices for 1st lactation in individual breeds, and the determination of fatty acids was performed by spectrophotometry followed by statistical evaluation. The resulting genotypes in selected breeds were only two, the *GG* genotype with a higher relative frequency than the genotype *AG*. There is no statistically significant difference between *FASN* genotypes depending on the milk yield and the fatty acids spectrum.

**Keywords:** milk, milk fat, fatty acids, fatty acid synthase, *FASN*



# Obsah

1	Literární přehled.....	11
1.1	Mléko .....	11
1.1.1	Spotřeba .....	11
1.1.2	Složení.....	13
1.1.3	Nežádoucí účinky .....	15
1.2	Mléčný tuk.....	16
1.3	Mastné kyseliny mléčného tuku .....	18
1.3.1	Význam nasycených mastných kyselin pro zdraví člověka .....	21
1.3.2	Význam nenasycených mastných kyselin pro zdraví člověka .....	22
1.4	Genom skotu.....	25
1.4.1	Genetické variabilita .....	26
1.4.2	Genetické markery.....	26
1.4.3	Genomická selekce .....	27
1.4.4	Celogenomová asociační studie GWAS .....	27
1.5	Vliv genetických faktorů na mastné kyseliny mléčného tuku.....	28
1.5.1	Vybrané kandidátní geny ovlivňující mastné kyseliny mléčného tuku	29
1.5.2	Gen <i>FASN</i> .....	31
2	Seznam zkratk .....	37
3	Seznam použité literatury .....	38

Následující pasáž **Úvod** o rozsahu 1 strany je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

# 1 Literární přehled

## 1.1 Mléko

Kravné mléko a mléčné výrobky mají dlouhodobou tradici v lidské výživě (Haug *et al.*, 2007), historie konzumace kravného mléka sahá až do neolitu (Barlowska *et al.*, 2011). Mléko je významným produktem živočišné výroby, který se hodí bez dalšího zpracování k přímé konzumaci. Je důležitou součástí stravy mnoha lidí, představuje plnohodnotnou potravinu, která hraje důležitou roli v lidské výživě, vzhledem k produkci tuku, bílkovin, cukrů, minerálních látek a vitamínů, ve velmi dobře využitelné formě. U velké části populace s převahou dětí, dospívajících a starších či oslabených jedinců je mléko téměř nenahraditelnou částí denního jídelníčku (Doležal *et al.*, 2000).

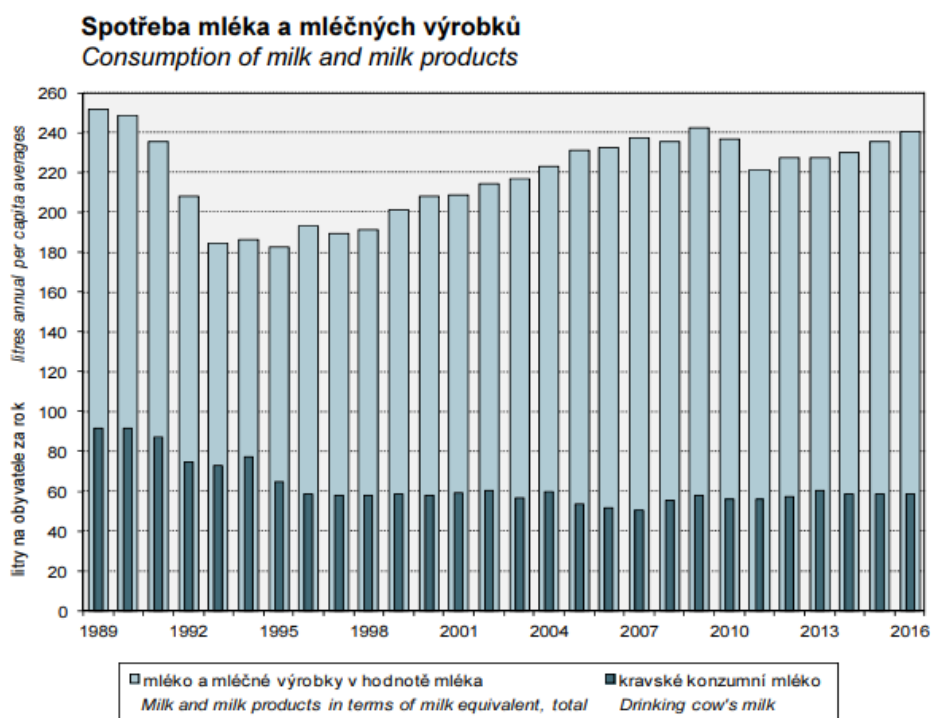
Kravné mléko obsahuje živiny potřebné pro růst a vývoj telete; je zdrojem lipidů, bílkovin, aminokyselin, vitamínů a minerálů. Kolostrum se značně liší od mléka; nejvýznamnějším rozdílem je koncentrace mléčných bílkovin, která může být asi dvojnásobná v kolostru ve srovnání s pozdější laktací. Změna složení mléka v průběhu celého období laktace se shoduje s měnící se potřebou vývoje telete, která poskytuje různé množství složek důležitých pro zásobování živinami, specifickou a nespecifickou obranu hostitele, růst a vývoj. Specifické mléčné bílkoviny se podílejí na časném vývoji imunitní odpovědi, zatímco jiné se účastní neimunologické obrany (Skládanka *et al.*, 2014).

### 1.1.1 Spotřeba

Spotřeba mléka a mléčných výrobků se v jednotlivých regionech značně liší, v západních zemích se spotřeba mléka během posledních desetiletí snížila. Tento trend může být částečně vysvětlen údajnými negativními účinky na zdraví, které byly připisovány mléku a mléčným výrobkům. Tato kritika se objevila zejména proto, že mléčný tuk obsahuje vysoký podíl nasycených mastných kyselin, u nichž se předpokládá, že přispívají k srdečním onemocněním a obezitě (Haug *et al.*, 2007).

Z celkové zemědělské produkce v České republice zaujímá mléko asi čtvrtinový podíl a tím se řadí mezi ekonomicky nejvýznamnější produkty českých zemědělců. Genetický potenciál působí pozitivně na ekonomickou úroveň mléčné produkce, pokud dochází ke správnému propojení se systémem selekce, reprodukci, krmením, výživou a chovným prostředím (Doležal *et al.*, 2000).

Nejnovější data Českého statistického úřadu (ČSÚ) ukazují nárůst spotřeby mléka a mléčných výrobků od roku 2010 do roku 2016. Nejvyšší spotřeba od roku 1993 byla 242,4 l na obyvatele za rok 2009, z toho konzumní kravské mléko zaujímalo 55,9 l na obyvatele za rok. Obrázek 1 zobrazuje spotřebu mléka a mléčných výrobků od roku 1989 do roku 2016 (<https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2016>, 2018).



**Obrázek 1** - Spotřeba mléka a mléčných výrobků (Český statistický úřad – spotřeba potravin 2016); Zdroj: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2016>, 2018

Spotřeba 0,5 litru mléka denně dodává do těla významné množství živin, které jsou každý den potřeba. Mléčné složky se podílejí na metabolismu několika způsoby, např. poskytováním esenciálních aminokyselin, vitamínů, minerálních látek

a mastných kyselin nebo ovlivňováním absorpce živin. Mléčný tuk je rozmanitý a má široké spektrum mastných kyselin a lipidů (Haug *et al.*, 2007).

### 1.1.2 Složení

Složení mléka má dynamickou povahu, liší se podle stupně laktace, věku, plemene, výživy, energetické rovnováhy a zdravotního stavu vemene (Caroli *et al.*, 2009). Kravské mléko obsahuje přibližně 87 % vody, 4 až 5 % laktózy, 3 % bílkovin, 4 % tuku, 0,8 % minerálů a 0,1 % vitamínů (Pereira *et al.*, 2014).

Lipidy v mléce jsou emulgovány v globulích potažených membránami. Proteiny jsou ve formě koloidních disperzí jako micely. Kaseinové micely se vyskytují jako koloidní komplexy bílkovin, solí, a především vápníku. Laktóza a většina minerálů jsou v roztoku (Argov *et al.*, 2008).

Mléko je obecně považováno za důležitý zdroj bílkovin v lidské stravě a dodává přibližně 32 g bílkovin/l. Jeho bílkovinná část může být rozdělena na rozpustné a nerozpustné bílkoviny. Rozpustné bílkoviny, pojmenované jako syrovátkové bílkoviny, představují 20 % části mléčných bílkovin, zatímco nerozpustné bílkoviny, konkrétně kasein, představuje 80 %. Mléčné bílkoviny jsou klasifikovány jako vysoce kvalitní bílkoviny s ohledem na požadavky aminokyselinové složení, stravitelnost a biologickou dostupnost. Ve skutečnosti jsou mléčné bílkoviny často považovány za nejlepší zdroj bílkovin, když bereme v úvahu esenciální aminokyselinové hodnocení a stravitelnost bílkovin korigované aminokyselinovým hodnocením (Boye *et al.*, 2012).

Mléčné výrobky jsou významným zdrojem vápníku. Kravské mléko obsahuje vápník a hořčík v poměru cca 10 : 1 (124,2 mg vápníku a 9,9 mg hořčíku / 100 g) - (Hanuš *et al.*, 2008). V tomto poměru lépe pronikají ionty hořčíku buněčnými membránami následovány vápníkem (Doležal *et al.*, 2000).

**Tabulka 1** - Složení mléka, procentuální zastoupení jednotlivých složek v 0,5 l plnotučného mléka a jejich hlavní účinky na zdraví (Haug *et al.*, 2007)

Složky mléka	Koncentrace v 1 l pl. mléka	Procentuální podíl v 0,5 l pl. mléka na DDP	Účinky na zdraví
Tuk	33 g/l		Bohatý na energii
Nasycené mastné kyseliny	19 g/l		Zvyšuje HDL, LDL a celkový cholesterol. Inhibice bakterií a virů.
Kyselina olejová	8 g/l		Prevence srdečních onemocnění, posílení membrán
Kyselina laurová	0,8 g/l		Antivirové a antibakteriální
Kyselina myristová	3 g/l		Zvyšuje LDL a HDL
Kyselina palmitová	8 g/l		Zvyšuje LDL a HDL
Kyselina linolová	1,2 g/l		Omega-6 FA
$\alpha$ -linolenová	0,75 g/l		Omega-3 FA
Bílkoviny	32 g/l	30 – 40 %	Esenciální aminokyseliny, bioaktivní proteiny, zvýšená biologická dostupnost
Laktóza	53 g/l		Umožňuje vstřebání vápníku a fosforu
Vápník	1,1 g/l	40 – 50 %	Posiluje kosti, zuby, zlepšuje krevní tlak, reguluje metabolismus tuku
Hořčík	100 mg/l	12 – 16 %	Prevence srdečních onemocnění, léčba astmatu
Zinek	4 mg/l	18 – 25 %	Imunitní funkce, genová exprese
Selen	37 $\mu$ g/l	30 %	Prevence rakoviny, alergiím, srdečních onemocnění
Vitamin E	0,6 mg/l	2 %	Antioxidant
Vitamin A	280 $\mu$ g/l	15 – 20 %	Posiluje zrak, podporuje dělení buněk
Kyselina listová	50 $\mu$ g/l	6 %	Podpora syntézy DNA, dělení buněk a metabolismus aminokyselin
Riboflavin	1,83 mg/l	60 – 80 %	Zabraňuje ariboflavinoze
Vitamin B <sub>12</sub>	4,4 $\mu$ g/l	90 %	Klíčová role v metabolismu folátů

Bezpochybně je mléko výživově bohaté; je dobrým zdrojem bílkovin s vysokou biologickou hodnotou s kombinovanými funkcemi pro imunitní systém, stejně tak živin s transportními a absorpčními schopnostmi, důležitých vitamínů a esenciálních minerálů. Navzdory některým nedávným kontroverzním hypotézám o možných negativních účincích z konzumace mléka, které se projeví poruchou vstřebávání laktosy a symptomy intolerance, které by byly v dospělosti přirozené, nebyly zjištěny žádné jasné mechanismy, silné důkazy, ani jasné argumenty, které by zcela vyloučily, průměrnou konzumaci mléka (Mullie *et al.*, 2016).

### 1.1.3 Nežádoucí účinky

Existují dva hlavní nežádoucí účinky způsobené požitím mléka. Prvním je laktózová intolerance, která znamená vyhýbání se mléku a vede jedince ke konzumaci upravených mléčných výrobků s nižším obsahem laktózy. A druhým je alergie na kravskou mléčnou bílkovinu a ta znamená úplné vyloučení kravských mléčných výrobků.

#### 1.1.3.1 Laktózová intolerance

Laktóza je hlavní sacharid přítomný v mléce. Jedná se o disacharid složený z glukózy a galaktózy. Je hydrolyzován  $\beta$ -galaktosidázou, známou jako laktáza. Tento enzym je spojen s membránou sliznice tenkého střeva a poté, co je laktóza hydrolyzována, obě monosacharidová glukóza a galaktóza jsou absorbovány a transportovány do jater přes portální žílu, kde je galaktóza přeměněna na glukózu (Lomer *et al.*, 2008). U savců se aktivita  $\beta$ -galaktosidázy významně snižuje po odstavení, to se zjevně neděje ve stejném stádiu u lidí. Činnost  $\beta$ -galaktosidázy zůstává i v dospělosti a symptomy intolerance vznikají, když se objeví enzymatický nedostatek (Schaafsma *et al.*, 2008).

Laktózová intolerance sama způsobuje několik žaludečně střevních příznaků vyvolaných laktózou a fermentací cukru v tlustém střevě. Abdominální křeče, nadýmání, plynatost, průjem, nevolnost a zvracení jsou časté nežádoucí příznaky. Během fermentace vzniká několik sloučenin, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, metan a oxid uhličitý, které mohou také ovlivňovat motilitu trávicího traktu způsobující zácpu, zvýšený tlak uvnitř střev a zvýšenou dobu průchodu střevy (Berkey *et al.*, 2009).

#### 1.1.3.2 Alergie na bílkovinu kravského mléka

Alergie na kravské mléčné bílkoviny je obecně první potravinová alergie zjištěná u dětí a její prevalence se pohybuje v rozmezí 2 % až 7,5 % (Caffarelli *et al.*, 2010). Nejčastěji jsou tyto alergie způsobeny syrovátkovými bílkovinami, zejména  $\beta$ -laktoglobulinem, ale také mohou být podněcovány kaseinem.

Alergie na kravské mléčné bílkoviny může být spojena s reakcí IgE (Imunoglobulin E) a nežádoucí následky mohou být okamžité (zprostředkované IgE) nebo zpožděné (nejsou zprostředkovány IgE). Mezi okamžité reakční příznaky patří anafylaxe, kožní reakce s kopřivkou a ekzémem, respirační onemocnění a problémy trávicí soustavy včetně zvracení, průjmu a krvavé stolice (Fiocchi *et al.*, 2010).

## 1.2 Mléčný tuk

Tuk v mléce je bohatým zdrojem energie, nositelem chuti mléka a také nositelem důležitých vitamínů rozpustných v tucích (vitamín E, A a D) - (German a Dillard, 2010). Mléčný tuk patří mezi nejkomplicovanější přírodní tukové komplexy. V mléce se vyskytuje v podobě tukových kuliček (velké v průměru 0,5 až 10 mikrometrů, většinou 2,5 až 3,5 mikrometrů) obalených proteinovými membránami. Do mléka se tuk uvolňuje prostřednictvím apokrinní sekrece v sekrečním epitelu alveolů mléčné žlázy a jeho obsah v mléce je především závislý na plemeni krav, doživosti, krmení, stádiu laktace a sezoně. Plemena Jersey a Guernsey mají nejvyšší obsahy tuku v mléce, plemena s kombinovanou užitkovostí vykazují střední obsahy a nejnižší mají mléčná plemena skotu (Doležal *et al.*, 2000).

Tuk je v kravském mléce přítomný v globulích jako emulze O/V (olej ve vodě). Tukové kapky jsou tvořeny endoplazmatickým retikulem v epitelálních buňkách alveolů a potažené povrchovým materiálem proteinů a polárních lipidů. Když jsou vyloučeny, dojde k obalení buňky plazmatickou membránou. Složky připojené membrány mohou představovat 2 až 6 % hmotnosti globule. Membrána mléčných tukových globulí je složena převážně z polárních lipidů, membránově vázaných a přidružených proteinů (Argov *et al.*, 2008). Lipidová frakce zahrnující přibližně 30 % membránového materiálu zahrnuje fosfolipidy (25 %), cerebrosidy (3 %) a cholesterol (2 %). Zbývajících 70 % membránového materiálu jsou bílkoviny, z nichž mnohé jsou enzymy. Velikost mléčných tukových globulí se zvětšuje se zvyšujícím se obsahem tuku v mléce. Počet mléčných tukových globulí je přibližně  $10^{10}$ /ml. Velikost mléčných tukových globulí má rozhodující vliv na stabilitu a technologické vlastnosti mléka. Mléčné tukové globule jsou odolné



vůči pankreatické lipolýze v tenkém střevě, pokud nejsou nejprve vystaveny žaludeční lipolýze (Månsson, 2008).

Biosyntéza kravského mléčného tuku je komplexní proces, který je regulován sítí genů kódujících soubor regulátorů transkripce a nukleárních faktorů (Olsen *et al.*, 2017). Většina mléčného tuku je tvořena v mléčné žláze z nízkomolekulárních mastných kyselin, které jsou produktem bacherového zkvašování cukernatých složek (Doležal *et al.*, 2000).

V průměru mléko obsahuje asi 33 g celkového tuku/l. Triacylglyceroly, které tvoří přibližně 98 % lipidové frakce, jsou složeny z mastných kyselin různé délky (4-24 atomů uhlíku) – (Hein *et al.*, 2017). Každá molekula triacylglycerolu je sestavena z kombinací mastných kyselin, které molekule dávají kapalnou formu při tělesné teplotě (Månsson, 2008). Asi 33 % triglyceridů je tvořeno nenasycenými mastnými kyselinami a 67 % nasycenými. Mezi nejvíce zastoupené kyseliny se řadí kyselina olejová, palmitová, myristová a stearová (Doležal *et al.*, 2000). Dalšími mléčnými tuky jsou diacylglyceroly (okolo 2 % lipidové frakce), cholesterol (méně než 0,5 %), fosfolipidy (okolo 1 %) a volné mastné kyseliny (okolo 0,1 %). Zvýšená hladina volných mastných kyselin v mléce by mohla mít na svědomí nepříznivou chuť mléka a mléčných výrobků. Kromě toho mléčný tuk obsahuje stopové množství uhlovodíků, vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E), aromatických látek a dalších složek získaných z krmiva (Pereira *et al.*, 2014). Mléčný tuk obsahuje přibližně 400 různých mastných kyselin, které z něj činí nejkompexnější tuk ze všech přírodních tuků (Hein *et al.*, 2017).

Metody acidobutyrometrická (dle Gerbera) a extračně-gravimetrická (dle Röse-Gottlieba) jsou nejvíce využívány k určení obsahu mléčného tuku v praxi. V České republice se obsah tuku vyjadřuje v objemových procentech g/100 ml (g/1000 ml), jak je udává Gerberova metoda. Hmotnostní procenta g/100 g (g/1000 g) jsou označením ve světě podle extrakční metody nebo modifikované acidobutyrometrické metody (Doležal *et al.*, 2000).

Mlékárenský průmysl od roku 1980 přizpůsobil mléko potřebě a zájmům spotřebitelů. Hledání méně kalorických produktů znamenalo vytvoření nových strategií, které by zajistily bohatou výživu, správnou chuť, texturu a vůni s nižším obsahem tuku, a tím i nižším energetickým obsahem (Pereira *et al.*, 2014).

## 1.3 Mastné kyseliny mléčného tuku

Základní stavební jednotkou tuků jsou mastné kyseliny (FA). FA jsou složeny z řetězce atomů uhlíku, na něž jsou navázány atomy vodíku. Pokud jsou všechna vazebná místa na atomech uhlíku obsazena, jedná se o nasycené = satureované FA. Jedná se např. o FA palmitovou: C 16:0 a FA stearovou: C 18:0. Nenasycené FA vytvářejí dvojně vazby mezi atomy uhlíku a podle počtu dvojných vazeb se dělí na monoenové FA (jedna dvojná vazba) a polyenová (dvě, tři a více dvojných vazeb) - (Mourek *et al.*, 2007). Nasycené FA tvoří 65-70 % celkového tuku, nenasycené monoenové FA 27-33 % a nenasycené polyenové FA 3-5 % (Hein *et al.*, 2017).

**Tabulka 2** - Názvosloví hlavních mastných kyselin mléčného tuku (Kala, 2014)

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Poloha dvojných vazeb	Konfigurace dvojných vazeb	Symbol
<b>Nasycené mastné kyseliny</b>				
Máslaná	4			C4:0
Kapronová	6			C6:0
Kaprylová	8			C8:0
Kaprinová	10			C10:0
Laurová	12			C12:0
Myristová	14			C14:0
Palmitová	16			C16:0
Stearová	18			C18:0
Arachová	20			C20:0
<b>Nenasycené monoenové kyseliny</b>				
Olejová	18	9	<i>cis</i>	C18:1n9c
<b>Trans-monoenové kyseliny</b>				
Palmitelaidová	16	9	<i>trans</i>	C16:1t
Petroselaidová	18	6	<i>trans</i>	C18:1n6t
Elaidová	18	9	<i>trans</i>	C18:1n9t
Vakcenová	18	11	<i>trans</i>	C18:1n11t
Cetelaidová	22	11	<i>trans</i>	C22:1n11t
Brassidová	22	13	<i>trans</i>	C22:1n13t
<b>Nenasycené polyenové kyseliny</b>				
Linolová	18	9, 12	<i>cis, cis</i>	C18:2n6c
$\alpha$ -linolenová	18	9, 12, 15	<i>all-cis</i>	C18:3n3
Arachidonová	20	5, 8, 11, 14	<i>all-cis</i>	C20:4n6

Hlavní environmentální faktory, o kterých je známo, že ovlivňují složení mastných kyselin v mléku, jsou výživa, fáze laktace a roční období (Hein *et al.*, 2017). Výživa může ovlivnit koncentraci lipidů a složení mastných kyselin v mléce, ale rozsah, v jakém se může tato změna vyskytnout, se liší u druhů a mezi různými

stadii laktace tohoto druhu. Například u nepřežvýkavců složení mastných kyselin v mléce odráží složení mastných kyselin v jejich výživě. U přežvýkavců je však většina strávených nenasycených mastných kyselin v bachoru snížena biohydrogenací a do mléka je zavedeno mnoho nových mastných kyselin bakteriálního původu, což ztěžuje kontrolu složení mastných kyselin v mléce podle způsobu výživy. Současně může výživa ovlivnit mikrobiální populaci bachoru a v důsledku toho změnit složení mastných kyselin v mléce. Důležité je znát přínos *de novo* lipogeneze v mléčné žláze k biosyntéze lipidů v mléku, aby se lépe porozumělo účinkům výživy na složení mléčných mastných kyselin (Nafikov, 2010).

Mastné kyseliny v mléce jsou odvozeny téměř stejným způsobem ze dvou zdrojů, z krmiva a z mikrobiální aktivity v bachoru krávy (Månsson, 2008). Nepřežvýkavci využívají glukózu jako hlavní uhlíkový zdroj pro *de novo* lipogenezi (Nafikov, 2010)., zatímco přežvýkavci si syntetizují triacylglyceroly v sekrečních buňkách mléčné žlázy z glycerolu a mastných kyselin. Mastné kyseliny pocházejí z krevních lipidů a nebo jsou syntetizovány *de novo* v sekrečních buňkách mléčné žlázy. *De novo* syntéza využívá pro syntézu C4:0 – C14:0 a poloviny C16:0 kyselinu octovou a kyselinu  $\beta$ -hydroxymáselnou. Přičemž kyselina octová i máselná vzniká při fermentaci krmných složek v bachoru. Kyselina máselná, která je produkována bakteriemi, je přeměněna během vstřebávání epitelem bachoru na kyselinu  $\beta$ -hydroxymáselnou. Mléčný tuk obsahuje určité mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků, jako je kyselina pentadekanová (15:0) a kyselina heptadekanová (17:0). Tyto dvě mastné kyseliny jsou syntetizovány bakteriální flórou v bachoru. Zbývající C16:0 a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem pocházejí z krevních lipidů a z lipolýzy triacylglycerolů v tukové tkáni. Mastné kyseliny se středně dlouhým a dlouhým řetězcem a hlavně C18:0, mohou být desaturovány v mléčné žláze za vzniku odpovídajících monoenových FA (Olsen *et al.*, 2017).

Mastné kyseliny s krátkým a středním řetězcem (C4:0 až C16:0 včetně), které jsou syntetizované *de novo* v mléčné žláze, mají střední až vysokou dědivost. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (tj. C16:0 a vyšší) jsou odvozeny z krevních lipidů, které pocházejí převážně z výživy a endogenních lipidů, mají nízkou až střední dědivost (Bouwman *et al.*, 2011).

Více než polovina mléčných mastných kyselin je nasycených, což představuje přibližně 19 g/l plnotučného mléka (Haug *et al.*, 2007). V rámci nasycených FA jsou

z kvantitativního hlediska nejdůležitější palmitová (30 %), myristová (11 %) a stearová (12 %). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem tvoří 11 % nasycených FA, převážně máselná (4,4 %) a kapronová (2,4 %). Ve frakci nenasyčených FA je kyselina olejová přítomna v koncentracích v rozmezí 24 až 35 %, zatímco polyenové FA tvoří přibližně 2,3 % všech FA, přičemž linolová a  $\alpha$ -linolenová činí 1,6 % a 0,7 %. Mléko obsahuje také trans mastné kyseliny, jako je kyselina vakcenová (2,7 %) a konjugovaná kyselina linolová (0,34 % -1,37 %) – (Pereira *et al.*, 2014).

**Tabulka 3** - Složení FA vyjádřené jako procento hmotnosti ze všech FA ve švédském kravském mléce v roce 2001 (Månsson, 2008)

Mastné kyseliny	Procentuální vyjádření hmotnosti ze všech FA	Směrodatná odchylka (SD)	Nejnižší pozorovaná hodnota	Nejvyšší pozorovaná hodnota
Máselná 4:0	4,4	0,1	4,0	5,1
Kapronová 6:0	2,4	0,1	2,1	2,9
Kaprylová 8:0	1,4	0,1	1,2	1,9
Kaprinová 10:0	2,7	0,2	2,4	3,5
Laurová 12:0	3,3	0,2	3,0	4,1
Myristová 14:0	10,9	0,5	10,0	12,1
Pentadekanová 15:0	0,9	0,0	0,8	1,1
Palmitová 16:0	30,6	0,9	28,7	34,1
Heptadekanová 17:0	0,4	0,0	0,4	0,5
Stearová 18:0	12,2	0,4	10,3	13,3
Arachová 20:0	0,2	0,0	0,2	0,2
Nasyčené FA celkem	69,4	1,7	67,1	74,4
Myristolejová 14:1	0,8	0,4	0,4	1,3
Palmitolejová 16:1	1,0	0,0	0,9	1,8
Olejová 18:1	22,8	1,0	19,7	24,7
Mononenasyčené FA cis,	25,0	1,0	22,2	26,7
Linolová 18:2	1,6	0,1	1,4	1,8
$\alpha$ -linolenová 18:3	0,7	0,0	0,6	0,9
Polynenasycené FA cis,	2,3	0,1	2,0	2,5
Vakcenová 18:1t	2,1	0,7	2,0	3,3
Trans FA celkem	2,7	0,7	0,6	3,9
Konjugovaná linolová	0,4	0,1	0,3	0,5

Termín konjugovaná kyselina linolová (CLA) se běžně vztahuje ke skupině oktadekadienových izomerů odvozených z kyseliny linolové, které jsou výsledkem biohydrogenačních reakcí prováděných gastrointestinálními mikroby přežvýkavců. Tato skupina mastných kyselin si zasluhuje další pozornost kvůli svým přínosům pro zdraví v kardiovaskulárním a imunitním systému, stejně jako v protirakovinových vlastnostech a hypolipidemických účincích (Benjamin *et al.*, 2009). V rámci několika zahrnutých sloučenin jsou považovány za nejaktivnější izomery cis-9, trans-11 a trans-10, cis-12. Množství CLA v mléce může být poměrně variabilní, hlavně díky ročnímu období nebo různé výživě zvířat. Mléčné výrobky obsahují cca 70 % doporučené denní dávky CLA (Pereira *et al.*, 2014). Obsah nasycených FA je nejnižší v létě, kdy se krávy pasou na pastvě a nejvyšší v zimě kvůli zimní krmné dávce. Obsah nenasyčených FA je naopak nejvyšší v letním období (Månsson, 2008).

### **1.3.1 Význam nasycených mastných kyselin pro zdraví člověka**

Mastné kyseliny mají významný vliv na lidské zdraví, a to zejména ve vyspělých zemích, kde se klade důraz na jednotlivé složky příjmu potravy (Morris *et al.*, 2007). Nadměrná spotřeba nasycených tuků byla dříve spojena se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění (Mozaffarian *et al.*, 2010). Nejčastěji uváděný důvod, kvůli kterému nasycený tuk ovlivňuje riziko vzniku srdečních onemocnění, je zvýšení hladiny lipidů v krvi, zejména celkového cholesterolu (TC) a nízkodenzitního lipoproteinu (LDL) – (Siri-Tarino *et al.*, 2010). Nicméně tři hlavní nasycené mastné kyseliny přítomné v lipidové frakci mléka - palmitové, myristové a laurové - mají zcela odlišné metabolické účinky v krevních lipidech, které mohou mít komplexní účinky na kardiovaskulární onemocnění. Bylo prokázáno, že kyselina palmitová zvyšuje LDL; myristová zvyšuje TC; a zvyšování vysokodenzitního lipoproteinu (HDL) bylo přičítáno kyselině laurové (Ohlsson *et al.*, 2010).

Jsou známé konkrétní zdravotní účinky jednotlivých mastných kyselin. Kyselina máselná (4:0) je dobře známým modulátorem funkce genů a také může hrát roli při prevenci rakoviny. Kyseliny kaprylová a kaprinová (8:0 a 10:0) mohou mít

antivirové účinky a kyselina kaprylová je schopna zpomalovat růst nádoru. Kyselina laurová (12:0) je nositelem antivirové a antibakteriální funkce a působí jako činidlo proti kazu a plaku zubů. *Helicobacter pylori* může být zničen kyselinou laurovou. Uvádí se, že kyseliny kaprinová a laurová jsou inhibitory cyklooxygenázy (COX-I a COX-II), tím zmírňují rozvoj zánětu. Kyselina stearová (18:0) nezvyšuje koncentraci cholesterolu v séru a není aterogenní (Haug *et al.*, 2007).

Zvýšení HDL cholesterolu způsobené nasycenými mastnými kyselinami – laurovou, myristovou a palmitovou má příznivý účinek, protože se zvyšuje transport cholesterolu. HDL může také působit jako antioxidant, zabraňuje oxidaci LDL částic v krvi a chrání před infekcemi a toxiny mikrobů (German a Dillard, 2004).

Obecně vysoká koncentrace nasycených mastných kyselin v lidské stravě vede ke zvýšení koncentrací cholesterolu v plazmě a v důsledku toho zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (CVD), které je příčinou smrti po celém světě. Zlepšení zdravotní nezávadnosti mléka prostřednictvím výběru složení mastných kyselin se stává jedním z primárních opatření, které by mohlo snížit výskyt CVD mezi lidmi (Nafikov, 2010). Několik studií ukázalo, že mléčné výrobky s nízkým obsahem tuku působí příznivě na změny cholesterolu v séru (Marckmann *et al.*, 1994). Bylo prokázáno, že 34 g mléčného tuku denně nepředstavuje negativní dopad na pravděpodobnost vzniku infarktu myokardu (Haug *et al.*, 2007).

### **1.3.2 Význam nenasycených mastných kyselin pro zdraví člověka**

Trávení mléčného tuku, z 98 % ve formě triacylglyceridů (TAG), uvolňuje bioaktivní mastné kyseliny, které jsou absorbovány tenkým střevem a poskytují spoustu benefitů pro zdraví. Polynenasycené mastné kyseliny s délkou řetězce 18 uhlíků, které tvoří přibližně 2,3 % FA v mléce, byly spojeny se zlepšením duševního zdraví, snižováním zánětů, inhibicí některých nádorů a prevencí mnoha chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární nemoci, diabetes a obezita. Hlavními "zdravými" FA jsou omega-3 FA a konjugované kyseliny linolové (CLA). Primární omega-3 FA v mléce je kyselina  $\alpha$ -linolenová (cis-9, cis-12, cis-15 18: 3). CLA jsou izomery kyseliny linolové (cis-9, cis-12 18: 2) s kyselinou rumenovou

(cis-9, trans-11 18: 2), jednou z neaktivnějších látek CLA zahrnující 92 % CLA v mléce (Tunick a Hekken, 2017).

Kyselina olejová (18: 1) je jediná nenasyčená mastná kyselina s nejvyšší koncentrací v mléku, která představuje přibližně 8 g / l plnotučného mléka. Mléko a mléčné výrobky tak v mnoha zemích přispívají k příjmu kyseliny olejové ve stravě. V Norsku přibližně čtvrtina průměrného příjmu kyseliny olejové pochází z mléka a mléčných výrobků. Kyselina olejová je považována za příznivou pro zdraví, protože strava s vysokým množstvím mononenasyčených mastných kyselin snižuje koncentraci cholesterolu v plazmě, LDL-cholesterolu a triacylglycerolu (Haug *et al.*, 2007).

Kyselina olejová je stabilnější vůči oxidaci než omega-3 (kyselina  $\alpha$ -linolenová) a omega-6 (kyselina linolová) a může částečně nahradit tyto mastné kyseliny jak v triacylglycerolech, tak v membránových lipidech. Vysoký poměr mezi kyselinou olejovou a polynenasycenými mastnými kyselinami může chránit lipidy, například LDL, vůči napadení oxidačními stresory, jako je cigaretový kouř, ozon a dalšími oxidanty. Studie ukázaly, že strava bohatá na mononenasyčené i polynenasycené mastné kyseliny poskytuje lepší ochranu proti ateroskleróze a kardiovaskulárním onemocnění než strava bohatá pouze na polynenasycené mastné kyseliny (Nicolosi *et al.*, 2004).

V mléce je poměr mezi mastnými kyselinami omega-6 a omega-3 nízký a tudíž příznivý. Poměr je ovlivněn složením krmné dávky a při vhodném sestavení krmné směsi může být nižší než 2:1. Při správném režimu krmení může být mléko a maso z přežvýkavců hlavním zdrojem omega-3 mastných kyselin v lidské stravě, jako je tomu ve Francii. Příznivá strava by měla být bohatá na kyselinu olejovou a poměr mezi omega-6 a omega-3 mastnými kyselinami by měl být 1-2:1 (Thorsdottir *et al.*, 2004).

Kravné mléko, mléčné výrobky a hovězí maso jsou hlavními zdroji izomeru konjugované kyseliny linolové (cis9, trans11-C18:2; CLA). Obsah izomeru cis9, 11trans-CLA se značně liší, ale může představovat okolo 0,6 % tukové frakce. Pozitivní účinek na zdraví byl u CLA prokázán. Izomer cis9, 11trans-CLA reguluje koncentraci plazmatických lipidů u lidí i zvířat, může také zlepšit stav plazmatického cholesterolu (Bell *et al.*, 2006). Mléčné potraviny s vysokým obsahem tuku a CLA

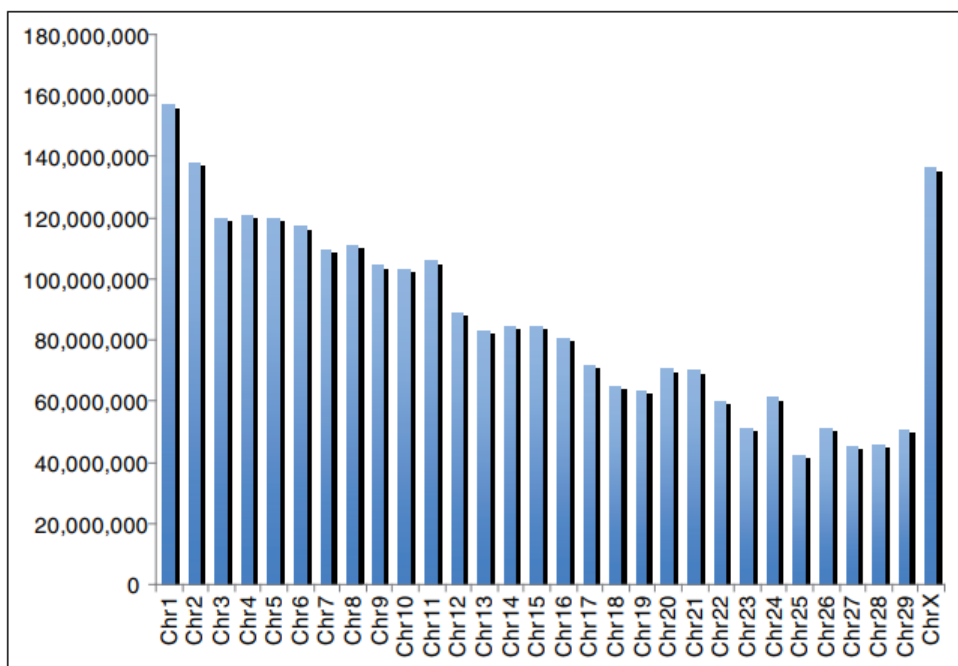
mohou snížit riziko rakoviny tlustého střeva. Efekt kyseliny linolové v metabolismu a její antiproliferační účinek činí kyselinu zajímavou a jako možné terapeutické činidlo v nutriční léčbě rakoviny. Mechanismů, kterými CLA může ovlivnit metabolismus, je mnoho. Předpokládá se, že CLA soupeří s kyselinou arachidonovou v cyklooxygenázové reakci, což vede ke snížení koncentrace prostaglandinů a tromboxanů 2. série. CLA může potlačit genovou expresi cyklooxygenázy a snížit uvolňování prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNFalfa a interleukiny u zvířat (Akahoshi *et al.*, 2004).



## 1.4 Genom skotu

Genom představuje souhrnné genetické založení organismu (Beran, 2010). Informace o velikosti a složení genomu skotu poskytuje řada databází. Databáze genomu skotu (BGD - Bovine Genome Database) se používá k řešení základních otázek v biologii a vývoji přežvýkavců, a také k identifikaci genů spojených s komplexními znaky, které se týkají produkce masa a mléka, a zdraví zvířat. Cílem BGD je podpora výzkumu genomiky skotu tím, že poskytuje anotace genomu a nástroje pro získávání dat. (Elsik *et al.*, 2016).

Zimin *et al.* (2009) sestavili genom *Bos taurus*, který obsahoval 2 857 605 192 bp, z čehož 2 612 820 649 bp bylo umístěno na jednom z 30 chromozomů. Obrázek č. 2 zobrazuje množství sekvencí umístěné v každém z 29 autozomů a chromozomu X.



Obrázek 2 - Množství sekvencí (bp) v každém chromozomu (Zimin *et al.*, 2009)

## 1.4.1 Genetické variabilita

Fenotypová variabilita může být odrazem genetické variability. Technika gelové elektroforézy slouží ke studiu genetické variability u všech druhů organismů. Pomocí techniky gelové elektroforézy lze nalézt rozdíly v aminokyselinovém složení proteinů. Technikou gelové elektroforézy dojde k separaci makromolekuly na základě jejich velikosti a náboje. V gelu se pohybují menší, více nabitě molekuly rychleji než větší, méně nabitě molekuly. Proteiny lišící se velikostí a nábojem se od sebe v gelu oddělují. Gelová elektroforéza proteinů tedy umožňuje detekovat variabilitu na úrovni genových produktů. Proteiny vykazující elektroforetickou variabilitu se nazývají polymorfní, jestliže alespoň dvě z těchto variant mají v populaci vyšší četnost než 1 %. Technika gelové elektroforézy se zaměřuje na genové produkty, nikoli na geny jako takové. Nekódující složky genů (promotory, introny, zesilovače) nelze tímto postupem analyzovat. Metoda nevypovídá nic o variabilitě v negenových částech genomu, které u eukaryot tvoří většinu DNA.

K analýze variability ve funkčně odlišných oblastech DNA (v exonech a intronech) lze použít různé metody, např. srovnání sekvencí, srovnání polymorfismu mikrosatelitních lokusů, genotypizaci SNP na čipech atd. Složité počítačové programy analyzují data a identifikují variabilitu mezi jedinci (Snustad a Simmons, 2009).

## 1.4.2 Genetické markery

Ekonomicky nejdůležitější znaky u mléčného skotu jsou znaky kvantitativní. Tvoří souvislé spektrum hodnot a mají komplexní povahu, neboť jsou závislé na genotypu stejně jako na vlivu prostředí. Předpokládá se, že tyto znaky jsou řízeny více geny nebo lokusy kvantitativních znaků (QTL) rozptýlenými v genomu. Jednotlivci, kteří jsou charakterizováni zvýšenou produktivitou, mají tendenci výskytu vyššího počtu preferovaných alel QTL než průměrná populace. Výběrem párů jedinců se zvýšenou produktivitou lze očekávat vyšší četnost příslušných alel u potomků a tím i vyšší produktivita ve srovnání s rodiči (Yudin *et al.*, 2015).

Nicméně proces výběru skotu založený na fenotypu má obecně nízkou výslednou účinnost chovu. Současné pokroky společně s širokým využitím molekulární genetiky umožňují identifikovat geny zodpovědné za ekonomicky užitečné znaky a používat je jako selekční markery (MAS, Marker Assisted Selection) ve šlechtění hospodářských zvířat (Smaragdov, 2009). Hodnocení živočišných genetických markerů spojených s kvantitativními charakteristikami je zvláště důležité pro znaky, které se projevují u dospělých jedinců nebo pouze u zvířat určitého pohlaví (produktivita, plodnost). (Yudin *et al.*, 2015).

Identifikace genetických markerů pro produkční znaky mléka a masa je hlavním cílem studií lokusů kvantitativních znaků (QTL). Výzkumy se obvykle provádějí k označení kandidátních genů umístěných uvnitř nebo velmi blízko QTL popsaným v genomu. Dalším krokem je ukázat rozdíly v sekvenci DNA, které mohou být popsány jako nukleotidy kvantitativních znaků (QTN). Fenotypové účinky jsou výsledkem výskytu QTN (Ciecierska *et al.*, 2013).

### **1.4.3 Genomická selekce**

Genomická selekce je ve skutečnosti formou MAS, která využívá informace o genetické diverzitě celého genomu. Za tímto účelem se provádí individuální genotypizace pro desítky tisíc polymorfních genetických markerů pokrývajících všechny chromozomy. Při hodnocení dojného skotu se první fáze genomické hodnocení plemenů skládá z konstrukce referenční populace, která se používá pro následné analýzy vztahů mezi genotypy a fenotypy (Smaragdov, 2013).

Obvykle se jedná o skupinu genotypovaných býků, jejíž potomstvo bylo testováno. Následně je definován statistický vztah mezi výsledky genotypizace a pronikáním specifického znaku u potomků. Po dokončení genomické testace je možné údaje použít k chovu mladých býků, které jsou založeny pouze na výsledcích genotypizace. (Yudin *et al.*, 2015).

### **1.4.4 Celogenomová asociační studie GWAS**

Genomové asociační studie mají vyšší schopnost detekovat QTL a poskytují přesnější odhady umístění QTL ve srovnání se studií vazeb. Nedávný vývoj v oblasti

molekulární genetiky umožnil provést asociační studie genomu, při použití tisíce SNP markerů pro detekci QTL (Bouwma *et al.*, 2011).

Komplexní nebo kvantitativní znaky jsou důležité v medicíně, zemědělství a vývoji, avšak donedávna bylo známo jen málo polymorfizmů, které způsobují změnu těchto znaků. Komplexní znaky jsou řízeny mnoha genetickými a environmentálními faktory. Genomové asociační studie (GWAS), založené na schopnosti testovat tisíce jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs), přinesly revoluci v našem chápání genetiky komplexních znaků (Wood *et al.*, 2014).

Data z GWAS mohou být použity pro tři účely:

- předpověď budoucích fenotypů,
- mapování kauzálních polymorfizmů v oblasti genomu a jejich identifikace
- získání přehledu o genetice komplexních znaků

GWAS dokáže odkrýt, kolik polymorfizmů ovládá znak, jaké jsou jejich účinky a frekvence alel, vazebnou nerovnováhu (LD) mezi nimi a jak se vyvíjejí (Goddard *et al.*, 2016).

## **1.5 Vliv genetických faktorů na mastné kyseliny mléčného tuku**

Složení mléčného tuku je vysoce ovlivňováno faktory životního prostředí, ale i genetiky. Byla zjištěna podstatná genetická variace spojená s kompozicí mléčného tuku, přičemž odhadovaná heritabilita jednotlivých FA byla nízká až střední (obvykle v rozmezí od 0,05 do 0,40). Tato fakta zvyšují možnost zlepšení nutričních vlastností mléčného tuku šlechtěním (Bastin *et al.*, 2013).

Identifikace genomových oblastí a jednotlivých genů, které jsou zodpovědné za genetickou variaci ve složení mléčného tuku, zlepší porozumění biologických cest podílejících se na syntéze mastných kyselin, a může poukázat na možnost změny složení mléčného tuku prostřednictvím selektivního chovu (Bouwman *et al.*, 2011), který umožní výběr zvířat produkujících mléko s lepším složením mastných kyselin (Nafikov, 2010).

Důležitými kroky k identifikaci polymorfismů v genech, které se podílejí na biosyntéze lipidů v mléce, je zkoumání:

- genů podílejících se na biosyntéze mléčného triacylglycerolu (TAG)
- absorpce mastných kyselin do mléčné žlázy
- transportu mastných kyselin uvnitř mléčných epitelálních buněk
- transkripční regulace některých lipogenních genů (Nafikov, 2010).

K objevení SNP v genech, které jsou předmětem zájmu, se používá sekvenování DNA. Po genotypizaci zvířat jsou haplotypy rekonstruovány a testovány na souvislost s kompozicí mastných kyselin v mléku (Nafikov, 2010).

### **1.5.1 Vybrané kandidátní geny ovlivňující mastné kyseliny mléčného tuku**

Kritérii pro výběr kandidátních genů jsou:

1. znalost funkce genu
2. úloha genu ve vývoji dané vlastnosti
3. znalosti o vlivu genu na fenotyp u jiných druhů
4. exprese genu v dané tkáni a to i během vývoje
5. gen se nachází v blízkosti QTL pro danou vlastnost

Ekonomicky důležité vlastnosti mléčného skotu jsou obvykle řízeny velkým počtem genů. Polymorfismus nukleotidových sekvencí těchto genů má za následek variabilní expresi komplexních kvantitativních znaků na fenotypové úrovni (Yudin *et al.*, 2015).

Zlepšení komplexních kvantitativních znaků ekonomického významu při výběru mléčného skotu závisí na identifikaci genů, které tyto vlastnosti řídí a na polymorfních variantách DNA v těchto genech, které ovlivňují fenotypový projev znaků. Bylo popsáno více než 11 543 QTL, což představuje více než 481 znaků u mléčného skotu (Hu *et al.*, 2013).

V průběhu let byly prováděny rozsáhlé studie zaměřené na nalezení kandidátních genů lokalizovaných v blízkosti QTL pro ekonomicky důležité znaky. Jakmile se spolehlivě stanoví vztahy mezi polymorfismy DNA a ekonomicky významným znakem, může být polymorfismus zahrnut do šlechtitelských programů.

Použití ověřených markerů může tak podstatně zvýšit účinnost výběru (Yudin *et al.*, 2015).

Kódující oblasti genu (exony) obsahují genetickou informaci, která se používá pro transkripci mRNA a její translaci do odpovídajícího proteinového produktu, který přímo nebo nepřímo ovlivňuje fenotypové rysy. Substituce nukleotidů v exonech je základem genetické diverzity a molekulární evoluce. Exony mohou pozitivně nebo negativně ovlivnit strukturu proteinů a/nebo úroveň exprese proteinu a tím ovlivnit fenotypovou vlastnost. Vzhledem k tomu, že hlavním účelem selekce skotu je dosažení vynikajících ukazatelů produkčních znaků, je žádoucí, aby polymorfní varianty DNA měly pozitivní vliv na výsledný znak. Jedinci nesoucí polymorfní varianty DNA s pozitivním účinkem na požadovaný znak jsou proto uchovány v základu populace plemene, zatímco hospodářská zvířata nesoucí variace s nepříznivými účinky jsou systematicky z populace vyloučena (Yudin *et al.*, 2015).

Bouwman *et al.* (2011) provedli genomovou asociační analýzu s použitím 50 000 SNP markerů pro identifikaci QTL pro jednotlivé mastné kyseliny v kravském mléce, která odhalila celkem 54 oblastí na 29 chromozomech, které byly významně spojeny s jednou nebo více mastnými kyselinami. *Bos Taurus* autozomy (BTA) 14, 19 a 26 vykazovaly velmi významné asociace se sedmi až deseti znaky, což ukazuje relativně velké procento celkové genetické variability. Mnoho dalších oblastí bylo významně spojeno s mastnými kyselinami. Některé z těchto oblastí obsahují geny, o kterých je známo, že se podílejí na syntéze tuků, nebo byly dříve identifikovány jako základní QTL pro obsah tuku nebo produkci, jako jsou *ABCG2* a *PPARGC1A* na BTA 6; *ACSS2* na BTA 13; *DGAT1* na BTA 14; *ACLY*, *SREBF1*, *STAT5A*, *GH* a *FASN* na BTA 19; *SCD1* na BTA 26; a *AGPAT6* na BTA 27.

Li *et al.* (2016) potvrzují zejména souvislost *FASN* a *PPARGC1A* s nasycenými mastnými kyselinami se středním řetězcem a nenasycenými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Jejich zjištění, týkající se genů a polymorfizmů odpovědných za změnu složení mastných kyselin v mléce, poskytuje užitečné informace, které lze kombinovat s programy chovu pro přizpůsobení obsahu mastných kyselin kravského mléka. Po sekvenování pomocí PCR identifikovaly celkem devět SNP pro gen *FASN*. Z toho se 3 nacházely v oblasti intronů a 6 v exonech.

## 1.5.2 Gen *FASN*

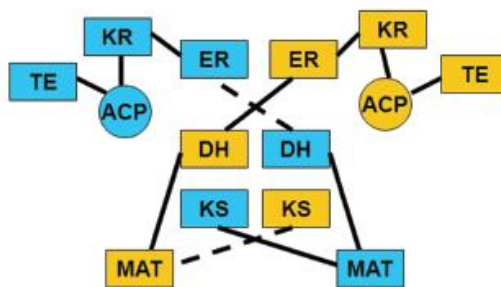
Významný QTL byl identifikován u skotu na chromozómu 19 (BTA19) obsahující gen syntázy mastných kyselin (*FASN*). Kvůli této skutečnosti a vzhledem k funkci syntázy mastných kyselin je *FASN* gen považován za potenciální kandidátní gen pro některé vlastnosti kvality mléčné produkce (Morris *et al.*, 2006).

Gen pro syntázu mastných kyselin (*FASN*) byl označen jako gen ovlivňující vlastnosti mléka u skotu, především produkcí mléčného tuku a složení mastných kyselin. Syntáza mastných kyselin kódovaná tímto genem je zapojena do metabolismu tuků, proto se předpokládá, že variabilita genu *FASN* by mohla ovlivnit tyto vlastnosti (Ciecierska *et al.*, 2013).

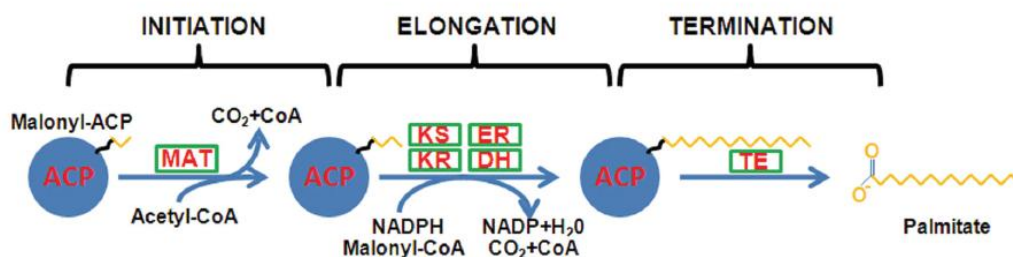
Syntáza mastných kyselin (FAS) je považována za multifunkční proteinový enzym, který katalyzuje hlavně *de novo* syntézu nasycených mastných kyselin a regulaci metabolismu lipidů. Produkty *FASN* genu působí jako substráty k produkci mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které jsou potřebné pro různé biologicky důležité činnosti včetně buněčného dělení (Niranjan *et al.*, 2016). FAS se účastní lipogeneze u dospělých jedinců a hraje velmi důležitou roli během embryonálního vývoje. V rámci zmíněného chromozomu bylo popsáno několik QTL spojených s obsahem tuku v mléce. Studie o struktuře genu *FASN* ukázaly výskyt několika SNP spojených s obsahem tuku a mastných kyselin v mléce (Ciecierska *et al.*, 2013).

Dle Liu *et al.* 2010 tvoří FAS (polypeptidový komplex) dimerizující podjednotky. Skládá se ze 7 katalytických domén:

- malonyl/acetyltransferáza (MAT)
- $\beta$ -ketoacylsyntáza (KS)
- dehydrogenáza (DH)
- enoylreduktáza (ER)
- $\beta$ -ketoacylreduktáza (KR)
- acyl carrier protein (ACP)
- thioesteráza (TE)



**Obrázek 3** - Schematické znázornění struktury FAS, který má dimerní formu ve tvaru “X” s každým monomerem ve stočené struktuře, aby byly umožněny interakce uvnitř a mezi podjednotkami; malonyl/acetyltransferáza = MAT,  $\beta$ -ketoacylsyntáza = KS, dehydrogenáza = DH, enoylreduktáza = ER,  $\beta$ -ketoacylreduktáza = KR, acyl carrier protein = ACP, thioesteráza = TE (Liu *et al.* 2010):



**Obrázek 4** - Syntéza FA katalyzovaná pomocí FAS – skládá se ze tří kroků probíhající v cytosolu: 1) Iniclace; 2) Elongace; 3) Terminace; při použití jednotlivých domén FAS. K syntéze jedné molekuly palmitátu (16:0) je nutná jedna molekula acetyl-CoA, sedm malonyl-CoA, sedm ATP a čtrnáct NADPH molekul (Liu *et al.* 2010).

Thioesterasová (TE) doména FAS hraje klíčovou roli v *de novo* biosyntéze regulováním délky produktu prostřednictvím ukončení syntézy mastných kyselin. Strukturálně se FAS TE doména skládá ze dvou subdomén, A a B s proměnnými délkami. Jako funkčně důležité místo pro produkci mastných kyselin s dlouhým řetězcem různých velikostí představuje rozhraní subdomén vysoce substrátově selektivní vazebné místo pro palmitoyl acylový substrát, který společně s doménou ACP v opačném směru 3'-5', pomáhá při ukončení řetězce (Chakravarty *et al.*, 2004).

Expres *FASN* je obecně řízena různými mechanismy, přičemž nejdůležitější je stabilita mRNA. Dalším mechanismem u skotu pro regulaci exprese *FASN* je



alternativní sestřih. U skotu je druhý transkript vytvářen alternativním sestřihem v exonech 8-10 *FASN* genu, což vede k předčasnému ukončení polypeptidového řetězce (Niranjan *et al.*, 2016).

Dva SNP, 763G>C a 16009A>G, které jsou ve vazebné nerovnováze, byly identifikovány v exonech 1 a 34 *FASN* genu u skotu. Obsah mléčného tuku u krav s homozygotními genotypy 763CC nebo 16009GG je významně vyšší než u krav s jinými genotypy (Roy *et al.*, 2006). SNP g. 14726C>A v exonu 32, který vede k substituci aminokyselin Leu>Ile je spojen s hladinou polynenasycených mastných kyselin v mléce (Marchitelli *et al.*, 2013).

U skotu je úloha FAS ekonomicky důležitá, protože reguluje obsah nasycených mastných kyselin v mléce a mase. Vzhledem k tomu, že složení mléka a masa má přímý dopad na kvalitu výrobku, stejně jako na lidské zdraví, bylo provedeno několik studií s cílem objasnit úlohu FAS ve složení mléčného tuku a masa u skotu. Bylo zjištěno, že pozměněné funkční domény FAS jsou spojeny s kvalitou hovězího masa a složením mléčného tuku u skotu. Zjistilo se také, že genetické varianty domény TH jsou spojeny s hladinou nasycených mastných kyselin a mononenasycených mastných kyselin u hovězího masa (Niranjan *et al.*, 2016).

Následující pasáž **Materiál a metodika** o rozsahu 5 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž **Výsledky a diskuze** o rozsahu 12 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž **Závěr** o rozsahu 1 strany je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

## 2 Seznam zkratek

BGD - bovine genome database

BTA - bos taurus autosome

CLA - conjugated linoleic acid

CVD - cardiovascular disease

ČSÚ - český statistický úřad

FA - fatty acid

FAS - fatty acid synthase

FASN - fatty acid synthase coding gene

GWAS - genome-wide association study

HDL - high-density lipoprotein

LD - linkage disequilibrium

LDL - low-density lipoprotein

MAS - marker assisted selection

MUFA – monounsaturated fatty acid

PCR - polymerase chain reaction

PUFA – polyunsaturated fatty acid

QTL - quantitative trait locus

QTN - quantitative trait nucleotide

RFLP - restriction fragment length polymorphism

SFA - saturated fatty acid

SNP - single-nucleotide polymorphism

UFA - unsaturated fatty acid

### 3 Seznam použité literatury

AKAHOSHI A., KOKA K., ICHINOSE F., KANEKO M., SHIMODA A., NONAKA K., YAMASAKI M., IWATA T., YAMAUCHI Y., TSUTSUMI K., SUGANO M. (2004). Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. *Lipids*, 39: 25-30.

ARGOV N., LEMAY D. G., GERMAN J. B. (2008). Milk fat globule structure and function; nanoscience comes to milk production. *Trends Food Sci Technol.*19: 617-623.

BARLOWSKA J., SZWAJKOWSKA M., LITWINCZUK Z., KROL J. (2011). Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 291-302.

BARTLETT J.M.S., STIRLING D. *PCR protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2003. 556 s. Methods in molecular biology, sv. 226. ISBN 978-1-59259-384-2.

BASTIN C., SOYEURT H., GENGLER N. (2013). Genetic parameters of milk production traits and fatty acid contents in milk for Holstein cows in parity 1-3. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 130: 118-127.

BELL J.A., GRINARI J.M., KENNELLY J.J. (2006). Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 89: 733-748.

BENJAMIN S., SPENER F. (2009). Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition and Metabolism*, 6:36.

BERAN O. Cesta do hlubin genetiky anebo co člověku přináší poznání genomu skotu. *Zpravodaj svazu chovatelů a plemenné knihy českého strakatého skotu*. 2010, 1(2010), 10-11. ISSN 1214-8016.

BERKEY C.S., COLDITZ G.A., ROCKETT H.R., FRAZIER A.L., WILLETT W.C. (2009). Dairy consumption and female height growth: prospective cohort study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention*, 18: 1881-1887.

BOUWMAN A.C., BOVENHUIS H., VISKER M.H., VAN ARENDONK J.A. (2011). Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genetics*, 12:43.

BOYE J., WIJESINHA-BETTONI R., BURLINGAME B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108: 183-211.

CAFFARELLI C., BALDI F., BENDANDI B., CALZONE L., MARANI M., PASQUINELLI P. (2010). Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Journal of Pediatrics*, 36: 5.

CAROLI A.M., CHESSA S., ERHARDT G.J. (2009). Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92:5335-5352

CHAKRAVARTY B., GU Z., CHIRALA S.S., WAKIL S.J., QUIOCHO F.A. (2004). Human fatty acid synthase: Structure and substrate selectivity of the thioesterase domain. *PNAS*, 101: 15567-15172.

CIECIERSKA D., FROST A., GRZESIAK W., PROSKURA W.S., DYBUS A., OLSZEWSKI A. (2013). The influence of fatty acid synthase polymorphism on milk production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23: 376-379.

DOLEŽAL O., HLÁSNÝ J., JÍLEK F., HANUŠ O., VEGRICHT J., PYTLOUN J., MATOUŠ E., KVAPILÍK J. (2000): *Mléko, dojení, dojírny*. Praha, Agrospoj, 241 s.

ELKINS K.M. *Forensic DNA Biology*. Academic Press, 2012. 224 s. ISBN 978-0-12-394585-3

ELSIK C.G., UNNI D.R., DIESH C.M., TAYAL A., EMERY M.L., NGUYEN H.N., HAGEN D.E. (2016). Bovine Genome Database: new tools for gleaning function from the *Bos taurus* genome. *Nucleic Acids Research*, 44: 834-839.

FIOCCHI A., SCHUNEMANN H.J., BROZEK J., RESTANI P., BEYER K., TRONCONE R., MARTELLI A., TERRACCIANO L., BAHNA S.L., RANCÉ F., EBISAWA M., HEINE R.G., ASSA'D A., SAMPSON H., VERDUCI E., BOUYGUE G.R., BAENA-CAGNANI C., CANONICA W., LOCKEY R.F. (2010). Diagnosis and Rationale for Action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126: 1119-1128.

GERMAN J.B., DILLARD C.J. (2004). Saturated fats: what dietary intake? *Journal of Clinical Nutrition*, 80: 550-559.

GERMAN J.B., DILLARD C.J. (2010). Saturated fats: a perspective from lactation and milk composition. *Lipids*, 45: 915-923.

GODDARD M.E., KEMPER K.E., MACLEOD I.M., CHAMBERLAIN A.J., HAYES B.J. (2016). Genetics of complex traits: prediction of phenotype, identification of causal polymorphisms and genetic architecture. *The Royal Society*, 283: 20160569.

HANUŠ O., GENČUROVÁ V., ŠPIČKA J., VYLETĚLOVÁ M., SAMKOVÁ E., SOJKOVÁ K., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J. *Možné přínosy mléka z konvenčního a ekologického zemědělství zdravé humánní výživě. Sborník příspěvků z mezinárodního semináře na téma Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků.* Rapotín. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. (2008). 91 s. ISBN 978-80-87144\_03-9.

HAUG A., HØSTMARK A.T., HARSTAD O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6:25.

HEIN L., SØRENSEN L.P., KARGO M., BUITENHUIS A.J. (2017). Genetic analysis of predicted fatty acid profiles of milk from Danish Holstein and Danish Jersey cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 110: 1-10.



<https://www.czso.cz/documents/10180/32782524/2701391602g.pdf/c561af73-ecc1-447f-9438-8844844c769f?version=1.0>, staženo dne 22. 2. 2018

HU Z.L., PARK C.A., WU X.L., REECY J.M. (2013). Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Research*, 41: D871-D879.

KALA R. Zastoupení vybraných mastných kyselin v mléčném tuku dojnic a koz. České Budějovice, 2014. Diplomová práce. Jihočeské univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta.

LI C., ALDAI N., VINSKY M., DUGAN M. E. R., MCALLISTER T. A. (2011). Association analyses of single nucleotide polymorphisms in bovine stearoyl-CoA desaturase and fatty acid synthase genes with fatty acid composition in commercial cross-bred beef steers. *Animal Genetics*, 43: 93-97.

LI C., SUN D., ZHANG S., YANG S., ALIM M.A., ZHANG Q., LI Y., LIU L. (2016). Genetic effects of FASN, PPARGC1A, ABCG2 and IGF1 revealing the association with milk fatty acids in a Chinese Holstein cattle population based on a post genome-wide association study. *BMC Genetics*, 17:110.

LIU H., LIU J.Y., ZHANG J.T. (2010). Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1:69-89.

LOMER M.C., PARKERS G.C., SANDERSON J.D. (2008). Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27: 93-103.

MÅNSSON H.L. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research*, 52: 1821.

MARCHITELLI C., CONTARINI G., DE MATTEIS G., CRISÀ A., PARISET L., SCATÀ M.C., CATILLO G., NAPOLITANO F., MOIOLI B. (2013). Milk fatty acid variability: effect of some candidate genes involved in lipid synthesis. *Journal of Dairy Research*, 80: 165-173.

MARCKMANN P., SANDSTROM B., JESPERSEN J. (1994). Low-fat, high-fiber diet favorably affects several independent risk markers of ischemic heart disease: observations on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis from a trial of middle-aged Danes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59: 935-939.

MARŠÁLEK M., VEJČÍK A., ZEDNÍKOVÁ J. *Atlas plemen hospodářských zvířat chovaných v České republice – Skot, koně, ovce a kozy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Expressprint Brno (2016). 1. vydání. 161 s. ISBN 978-80-7394-581-7.

MATSUMOTO H., INADA S., KOBAYASHI E., ABE T., HASEBE H., SASAZAKI S., OYAMA K., MANNEN H. (2012). Identification of SNPs in the FASN gene and their effect on fatty acid milk composition in Holstein cattle. *Livestock Science*, 144: 281-284.

MORRIS C.A., CULLEN N.G., GLASS B.C., HYNDMAN D.L., MANLEY T.R., HICKEY S.M., MCEWAN J.C., PITCHFORD W.S., BOTTEMA C.D., LEE M.A. (2007). Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mammalian Genome*, 18: 64-74.

MOZAFFARIAN D., MICHA R., WALLACE S. (2010). Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLOS Medicine*, 7: e1000252.

MULLIE P., PIZOT C., AUTIER P. (2016). Daily mil consumption and all-cause mortality, coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis of observation cohort studies. *BMC Public Health*, 16: 1236.

NAFIKOV R.A. (2010). Genetic regulation of bovine milk fatty acid composition: Improving the healthfulness of milk through selection. *Graduate Theses and Dissertations*, 11674.

NICOLOSI R.J., WOOLFREY B., WILSON T.A., SCOLLIN P., HANDELMAN G., FISHER R. (2004). Decreased aortic early atherosclerosis and associated risk factors in hypercholesterolemic hamsters fed a high- or mid-oleic acid oil compared to a high-linoleic acid oil. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 540-547.

NIRANJAN S.K., GOYAL S., DUBEY P.K., KUMARI N., MISHRA S.K., MUKESH M., KATARIA R.S. (2016). Genetic diversity analysis of buffalo fatty acid synthase (FASN) gene and its differential expression among bovines. *Gene*, 575: 506-512.

OH D., LEE Y., LA B., YEO J.M CHUNG E., KIM Y., LEE C. (2012). Fatty acid composition of beef is associated with exonic nucleotide variants of the gene encoding FASN. *Molecular Biology Results* 39: 4083-4090.

OHLSSON L. (2010). Dairy products and plasma cholesterol levels. *Food and Nutrition Research*, 54:5124.

OLSEN H.G., KNUTSEN T.M., KOHLER A., SVENDSEN M., GIDSKEHAUG L., GROVE H., NOME T., SODELAND M., SUNDSAASEN K.K., KENT M.P., MARTENS H., LIEN S. (2017). Genome-wide association mapping for milk fat composition and fine mapping of a QTL for de novo synthesis of milk fatty acids on bovine chromosome 13. *Genetics Selection Evolution*, 49:20.

PEREIRA P.C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30: 619-627.

ROHIT A., MAITI B., SHENOY S., KARUNASAGAR I. (2016). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian Journal of Medical Research*, 143: 72-78.

SCHAAFSMA G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18: 458-465.

SCHENNINK A., BOVENHUIS H., LEON-KLOOSTERZIEL K.M., VAN ARENDONK J.A., VISKER M.H. (2009). Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal Genetics*, 40: 909-916.

SIRI-TARINO P.W., SUN Q., HU F.B., KRAUSS R.M. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91: 502-509.

SKLÁDANKA J., DOLEŽAL O., HEGEDÜSOVÁ Z., HOLÁSE R., CHLÁDEK G., KOPEC T., KUČERA J., KROPSCH M., KVAPILÍK J., OFNER-SCHRÖCK E., ONDRÁKOVÁ M., STRAPÁK P. *Chov strakatého skotu*. Šumperk: Reprotisk s.r.o., 2014. 1. vydání 286 s. ISBN 978-80-7509-258-8.

SMARAGDOV M.G. (2009). Genomic selection as a possible accelerator of traditional selection. *Russian Journal of Genetics*, 45: 633-636.

SMARAGDOV M.G. (2013). Genomic selection of milk cattle. The practical application over five years. *Russian Journal of Genetics*, 49: 1089-1097.

SNUSTAD P.D., SIMMONS M.J. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. 874 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

THORSODOTTIR I., HILL J., RAMEL. (2004). Omega-3 fatty acid supply from milk associates with lower type 2 diabetes in men and coronary heart disease in women. *Preventive Medicine*, 39: 630-634.

TUNICK M.H., VAN HEKKEN D.L. (2017). Fatty acid profiles of in vitro digested processed milk. *Foods*, 6: E99.

WOOD A.R., ESKO T., YANG J., VEDANTAM S., PERS T.H. *et al.* (2014). Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nature Genetics*, 46: 1173-1186.

YUDIN N.S., VOEVODA M.I. (2015). Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle. *Russian Journal of Genetics*, 51: 506-517.

ZHANG S., KNIGHT T. J., REECY J. M., BEITZ D. C. (2008). DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. *Animal Genetics*, 39: 62-70.

ZIMIN A.V., DELCHER A.L., FLOREA L., KELLEY D.R., SCHATZ M.C., PUIU D., HANRAHAN F., PERTEA G., VAN TASSELL C.P., SONSTEGARD T.S., MARCAIS G., ROBERTS M., SUBRAMNIAM P., YORKE J.A., SALZBER S.L. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*, 10: R42.